

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年11月 5日

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-321887

[ST.10/C]:

[JP2002-321887]

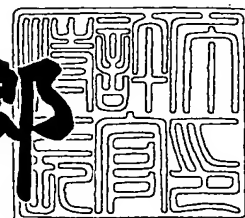
出 願 人
Applicant(s):

株式会社林原生物化学研究所

2003年 2月14日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3007533

【書類名】 特許願

【整理番号】 10097201

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C07K 14/705
C12N 5/16
C12N 15/06
G01N 33/00

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 有安 利夫

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 松本 修二

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 京野 文代

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 花谷 利春

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 新井 成之

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 池田 雅夫

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 栗本 雅司

【特許出願人】

【識別番号】 000155908

【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

【代表者】 林原 健

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035736

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トレハロース受容体並びにそれを用いるトレハロースの検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表における配列番号 1、2、3 及び 5 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、又は、配列表における配列番号 1、4 及び 5 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質からなる哺乳動物のトレハロース受容体。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のトレハロース受容体を人為的に発現させた動物細胞。

【請求項 3】 配列表における配列番号 1、2、3 及び 5 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、又は、配列表における配列番号 1、4 及び 5 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA を組み込んだ発現ベクターを動物細胞に導入する工程を含む、トレハロース受容体を人為的に発現させた動物細胞の製造方法。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のトレハロース受容体又は請求項 2 に記載のトレハロース受容体を人為的に発現させた動物細胞を用いることを特徴とするトレハロースの検出方法。

【請求項 5】 トレハロース受容体にトレハロースが結合することによって起こる生化学的反応を検出することを特徴とする請求項 4 に記載のトレハロースの検出方法。

【請求項 6】 生化学的反応の検出が、カルシウムイオンの流入を測定することによって行われる請求項 5 に記載のトレハロースの検出方法。

【請求項 7】 請求項 2 に記載のトレハロース受容体を人為的に発現させた動物細胞と、カルシウムイオンの検出試薬を含んでなるトレハロースの検出キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、哺乳動物におけるトレハロース受容体並びにトレハロース受容体を

用いるトレハロース検出方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

【非特許文献1】日本食品科学工学会誌、第45巻、第6号、381-384頁、1998年

【非特許文献2】サイエンス、289巻、116-119頁、2000年

【非特許文献3】ネイチャー、413巻、13号、211-225頁、2001年

【非特許文献4】セル、106巻、381-390頁、2001年

【非特許文献5】ネイチャー、416巻、14号、199-202頁、2002年

【0003】

トレハロースは、澱粉原料からの生産技術が確立されたことにより、安価に製造可能となり、トレハロースを配合した食品や化粧品が市場に出回るようになった。近年、消費者保護の観点から、食品や化粧品などの配合成分のデータを表示することが求められるようになり、これはトレハロースについても同様であって、表示の正当性を確認するためにも、食品や化粧品中のトレハロースを検出する方法が必要である。従来提案されているトレハロースの検出方法としては、非特許文献1で開示される検出方法、すなわち、食品などから糖類を抽出し、それをトリメチルシリル誘導体化した後、ガスクロマトグラフィーにより分離してトレハロースの含有量を計測するというものがある。この方法は、多くの食品に適用可能であり、ppm単位の精度で測定可能であるものの、試料から糖質成分を抽出精製する工程、トリメチルシリル誘導体化が必要であり、操作が煩雑であってより簡単な方法が求められている。

【0004】

トレハロースは、砂糖の45%の甘味度を舌により体感できることから、舌の味蕾に存在する味覚細胞により感知されていると考えられるので、トレハロース受容体の存在が示唆され、この受容体を用いれば、トレハロースの検出をより容易かつ簡便に行うことが可能になるものと思われるが、ヒトを含めた哺乳動物に

おけるトレハロース受容体は、その存在が未だ知られていない。すなわち、非特許文献2で開示されるように、ショウジョウバエにおいては、トレハロース受容体がクローニングされているが、本発明者等が得た知見によれば、ショウジョウバエのトレハロース受容体のDNA配列を利用して、マウスの舌組織からmRNAを調製し、遺伝子クローニングを試みたところ、ショウジョウバエで発見されたトレハロース受容体蛋白質に相当する蛋白質はマウスなどの哺乳動物において発見することはできなかった。

【0005】

非特許文献3には、スクロースの受容体をはじめとするさまざまな味覚に関する受容体が明らかにされ、例えば、非特許文献4で開示される甘味受容体としては、T1R2とT1R3のヘテロ2量体であるスクロース受容体や、非特許文献5で開示されるT1R1とT1R3のヘテロ2量体であるL-アミノ酸受容体が開示されている。また、非特許文献4には、G蛋白質の α サブユニットである、 $\alpha 15$ 、 $\alpha 16$ 及び αZ が上記甘味受容体の反応に関与していることが記載されている。しかしながら、これらの文献はいずれもトレハロースの受容体については何らの教示を与えるものでない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記のような背景の下に為されたもので、哺乳動物におけるトレハロース受容体を解明するとともに、それを用いて、抽出精製工程や誘導体化を必要とせず、試料中のトレハロースを直接的にかつ容易に検出する方法を提供することを課題とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、哺乳類におけるトレハロース受容体を解明すべく、研究を重ねた結果、意外にも、哺乳動物においては、スクロース受容体の一部とG蛋白質の α サブユニットとが組み合わさって、トレハロース受容体を形成していることを見出し、また、このトレハロース受容体を用いれば、トレハロースを特異的に、かつ、定量的に検出可能であることを確認し、本発明を完成するにいたった。

【0008】

すなわち、本発明は、哺乳動物におけるトレハロース受容体を提供するとともに、トレハロース受容体を発現させた細胞及びそれを用いたトレハロース検出方法を提供することにより、上記課題を解決するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明が明らかにしたトレハロース受容体とは、G蛋白質 α サブユニットの一種である $\alpha 15$ （配列表における配列番号1）、 $\alpha 16$ （配列表における配列番号2）、 αZ （配列表における配列番号3）を共発現させた細胞、若しくは、 $\alpha 15$ （配列表における配列番号1）とともに、モーディーら、モレキュラーファーマコロジー（M o l e c u l a r P h a r m a c o l o g y）、第57巻、13-23頁、2000年に開示される $\alpha 16/Z$ キメラ蛋白質（配列表における配列番号4）を共発現させた細胞において、甘味受容体の一つであるT1R3（配列表における配列番号5）を発現させることにより、細胞膜上に形成される新規な組み合わせの味覚受容体である。本発明で用いられるG蛋白質 α サブユニットやT1R3蛋白質は、哺乳動物由来であれば、特にそれら由来の動物種は限定されず、また、各蛋白質がそれぞれ異なる動物種のものとなってもよい。これらの蛋白質のアミノ酸配列及びそれをコードするDNA配列については、遺伝子データバンク、例えば「GENBANK」などに開示されるものを利用することができる。とりわけ、T1R3蛋白質及び $\alpha 15$ がマウス由来、 $\alpha 16$ 及び αZ がヒト由来であるものが、感度に優れるので好ましい。さらに、トレハロースを感受することができる範囲内で、各蛋白質においてアミノ酸の欠失、置換、付加があってもよい。また、これらの蛋白質を、例えば、T1R3に $\alpha 15$ 、 $\alpha 16$ 、 $\alpha 16/Z$ キメラ蛋白質を連結して発現させたり、それぞれの蛋白質を同一のベクターで発現させることができる。なお、上記の $\alpha 16/Z$ キメラ蛋白質（配列表における配列番号4）は、受容体発現に必要な遺伝子数を減じる効果があり、本発明に有利に利用できる。

【0010】

本発明で用いられるトレハロース受容体を発現させる細胞としては、種類、由

来動物などを問わず、本発明のトレハロース受容体が細胞膜上に形成され、かつ、それがトレハロースと結合又は反応することによって、細胞がなんらかの反応を示す限り、どのような細胞を用いてもよい。トレハロースに対する特異性を高めるために、味覚細胞などの味覚受容体を有する細胞を避け、味覚受容体を有しない細胞を用いるのが好ましい。とりわけ、ヒト胎児腎臓上皮細胞由来の293細胞株（理研ジーンバンク、RCB1637）は、味覚受容体を有しておらず、また、後述する細胞内カルシウムイオンの検出が比較的容易に行えるので、本発明において有利に用いられる。

【0011】

本発明で用いられるトレハロース受容体を発現させる方法としては、まず、上記の受容体蛋白質をコードするDNA、つまり、例えば、配列番号1乃至5に開示されるアミノ酸配列をコードするDNAを入手する必要がある。DNAを入手する方法としては、DNAの全部又は一部を化学合成により合成する方法、動物のゲノムDNA、mRNA若しくはcDNAから、ハイブリダイゼーション法やPCR法により選別採取する方法などが挙げられ、それらを適宜組み合わせて本発明に必要なDNAを得ることができる。

【0012】

上記のDNAにコードされるトレハロース受容体蛋白質を細胞膜上に発現させるには、適宜の動物細胞発現用発現ベクターに組み込み、哺乳動物細胞に導入すればよい。発現ベクターとしては、通常、動物細胞に用いられる発現ベクターを適宜選択すればよく、適宜の薬剤耐性遺伝子、発現プロモーター領域、ポリアダニル化部位、ポリリンカー、制限酵素切断部位、エンハンサー領域などを配した発現ベクターを用いることができ、プラスミドベクター、ウイルスベクター、コスミドベクターなど、どのような種類のベクターをも用いることができる。また、発現形態が一過的な発現であっても、恒常的な発現であってもよく、目的に応じて適宜選択すればよい。また、各G蛋白質及び受容体蛋白質をコードするDNAをそれぞれ単一の発現ベクターに組み込んでも、単一の発現ベクター上に複数種のG蛋白質及び受容体蛋白質をコードするDNAを組み込んで発現させてもよい。

【 0 0 1 3 】

本発明によるトレハロースの検出方法は、スクロース受容体の一部とG蛋白質 α サブユニットの一部との新規な組み合わせによるトレハロース受容体を膜表面に発現させた動物細胞に対して、トレハロースが含まれていると想定される試料を添加し、その中に含まれるトレハロースがトレハロース受容体と結合することによって引き起こされる生化学的な反応を測定することにより、試料中のトレハロースを検出するというものである。本発明に用いられる生化学的な反応としては、細胞内シグナル伝達系に関与する反応が挙げられ、それに関わる物質、例えば、サイクリックAMP、サイクリックGMP、サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ、プロテインキナーゼC、カルシウムイオンなどの量の増減を測定する方法が挙げられる。とりわけ、カルシウムイオンの流入を測定する方法が最も簡便かつ感度に優れる有力な手法であり、本発明において有利に実施できる。

【 0 0 1 4 】

細胞内におけるカルシウムイオンの測定方法としては、カルシウムイオンと結合することにより、蛍光を発する試薬、例えば、モレキュラープローブス社販売の商品名『Fluo-4, AM』などの細胞内におけるカルシウムイオン検出用試薬が挙げられ、反応させることによって発せられる蛍光を、市販のプレート式、キュベット式、フローサイトメトリー式の蛍光検出装置により測定する方法、蛍光顕微鏡などで肉眼的に観察する方法などが挙げられる。

【 0 0 1 5 】

本発明のトレハロースの検出方法によれば、様々な食品又は化粧品などを被検対象品として、それらに含有まれるトレハロースを特異的に測定することができる。被検対象品が固体、ペースト、ゲル又は親油性液体ならば、水性溶媒により被検対象品に含まれるトレハロースを溶解し、不溶物質を除去して試料とする。また、被検対象が親水性液体ならば、そのまま、あるいは、いったん乾燥固化したものを水性溶媒で再溶解したものをを用いることもできる。また、例えば、細胞毒性を有する物質、ミネラル、又は色素などの、トレハロースの検出に支障のある不純物質が試料中に混在する場合は、適宜の分離方法、例えば、活性炭吸着法

、有機溶媒抽出法、遠心分離法、膜濾過法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法などの方法で、また、不純物質を適宜の酸、アルカリ、還元剤、酸化剤などの薬剤、分解酵素などで処理し、試料からトレハロース以外の不要な物質を除去することもできる。また、必要ならば、トレハロース分解酵素であるトレハラーゼを処理した試料を陰性対象として用いれば、より正確なトレハロース含量が測定可能であり、特にバックグラウンドが高い場合は有利となる。本発明によるトレハロースの検出方法における検出感度は、試料溶液中におけるトレハロース濃度で5 mM以上乃至500 mMの範囲で測定可能である。したがって、試料溶液中のトレハロース濃度がこの範囲内でない場合は、試料を段階的に濃縮又は希釈することによって、上記測定範囲内になるように調節すればよい。

【0016】

本発明のトレハロースの検出方法は、上記の食品や化粧品に含まれるトレハロースの含量を測定することに用いられるほか、例えば、トレハロースなどの糖質を誘導体化することによる甘味度の増減効果を検討するといった、新規甘味料の検索にも利用できる。

【0017】

以下、実施例により、本発明を詳細に説明する。

【0018】

【実施例1】

<G蛋白質 α サブユニット蛋白質発現用ベクターの構築>

【0019】

【実施例1-1】

<G蛋白質 α サブユニット蛋白質 α 15をコードするDNAの調製>

マウス骨髓性白血病由来細胞株WEHI-3 (ATCC No. TIB-68) から、常法にしたがい、mRNAを含むRNAを抽出精製し、このRNA 1 μ gから、12.5 pmolのランダムヘキサマーをプライマーとして、ストラタジーン製の逆転写酵素である商品名『スーパースクリプトII RT』で、42℃で50分間反応することにより、第1ストランドcDNAを合成した。引き続

き、リボヌクレアーゼIにより混在するRNAを酵素分解し、PCRの鋳型用のcDNAを得た。また、G蛋白質 α サブユニット $\alpha 15$ DNA（配列表の配列番号6）の5'末端のDNA配列に制限酵素HindIII切断部位を含む塩基配列を付加したPCR用センスプライマー（配列表の配列番号7）、3'末端のDNA配列に制限酵素NotI切断部位を含む塩基配列を付加したPCR用アンチセンスプライマーを作製した（配列表における配列番号8）。上記cDNA及びPCR用プライマーを用いて、宝酒造株式会社販売の熱耐性DNAポリメラーゼである商品名『LA Taq DNAポリメラーゼ』により、常法にしたがいPCRを行い、G蛋白質 $\alpha 15$ をコードするDNAを得た。

【0.020】

【実施例1-2】

<G蛋白質 $\alpha 16$ /Zキメラ蛋白質をコードするDNAの調製>

ヒト骨髓性白血病由来細胞株HL-60（ATCC No. CCL-240）又はU937（ATCC No. CRL-1593.2）から、常法にしたがい、mRNAを含むRNAを抽出精製し、このRNA1 μ gから、12.5 pmolのランダムヘキサマーをプライマーとして、常法にしたがい、ストラタジーン製の逆転写酵素である商品名『スーパースクリプトII RT』で、42℃で50分間反応することにより、第1ストランドcDNAを合成した。引き続き、常法にしたがい、リボヌクレアーゼIによりRNAを酵素分解し、PCRの鋳型用のcDNAを得た。また、G蛋白質 $\alpha 16$ DNA（配列表の配列番号9）及びG蛋白質 αZ DNA（配列表の配列番号10）を得るべく、 $\alpha 16$ の開始コドン付近のDNA配列、すなわち塩基番号202から221までの配列の5'側に、制限酵素HindIII切断部位を付加したPCR用センスプライマー（配列表の配列番号11）、 $\alpha 16$ の塩基番号1196から1211までの相補配列の5'側に αZ の塩基番号946から960までの相補配列を付加したアンチセンスプライマー（配列表の配列番号12）を作製した。一方、 αZ DNAを得るべく、配列表における配列番号10の塩基番号946から960までの配列の5'側に $\alpha 16$ の塩基番号1195から1211までの配列を付加したPCR用センスプライマー（配列表の配列番号13）、 αZ の塩基番号1068から1086まで

の相補配列の5'側に制限酵素Not I切断部位を付加したアンチセンスプライマー（配列表の配列番号14）を作製した。これらcDNA及びPCRプライマーを用いて、宝酒造株式会社販売の熱耐性DNAポリメラーゼである商品名『LA Taq DNAポリメラーゼ』により、常法にしたがいそれぞれPCRを行い、G蛋白質 α 16及びG蛋白質 α ZをコードするDNAを得た。これらを混ぜ合わせ、熱変成した後、オーバーラップした部分をアニーリングさせた後、さらにPCRを行い、約1200bpの α 16/Zキメラ蛋白質をコードするDNAを得た。

【0021】

【実施例1-3】

＜G蛋白質 α 15及び α 16/Zキメラ蛋白質を共発現するベクターの構築＞

発現ベクターとして、ピューロマイシン耐性遺伝子、EF-1 α （延長因子）プロモーターなどを有するエッジ・バイオシステムズ社販売のプラスミドベクターpEAK12を採用し、その制限酵素Spe I切断部位に制限酵素EcoRV切断部位を付加した発現ベクターpEAKS1、及びpEAKS1の制限酵素切断部位BamHIにさらにEcoRV制限酵素切断部位を付加させた発現ベクターpEAKS2を常法にしたがい調製した。まず、実施例1-1で得たG蛋白質 α 15蛋白質をコードするDNA又は実施例1-2で得たG蛋白質 α 16/Zキメラ蛋白質をコードするDNAを、それぞれ制限酵素HindIII及びNot Iで消化し、pEAKS1又はpEAKS2のHindIII及びNot Iの位置に常法にしたがってライゲーションし、G蛋白質 α 15蛋白質をコードするDNAが挿入されたpEAKS1、及び、G蛋白質 α 16/Z蛋白質をコードするDNAが挿入されたpEAKS2を得た。次に、G蛋白質 α 16/Z蛋白質をコードするDNAが挿入されたpEAKS2を制限酵素EcoRVで消化し、プロモーター領域とともにG蛋白質 α 16/Zキメラ蛋白質をコードするDNA配列を含むDNA断片を調製し、それをG蛋白質 α 15蛋白質をコードするDNAが挿入されたpEAKS1のEcoRV制限酵素切断部位に、常法にしたがってライゲーションし、G α 15及びG α 16/Zキメラ蛋白質を共発現するベクター『pEAK/EF2-G α (15+16/Z)』を得た（図1参照）。なお、使用

したPCRプライマーの一覧表を表1に示す。

【0022】

【表1】

G蛋白質 質	GENB ANK アクセス 番号	由来	PCR用プライマー 5' 3'	配列表 における配列 番号	備 考
$\alpha 15$	M806 32	マウ ス	CGCAAGCTT - TCTGTGAAGCGCCCACCATG	配列番 号7	HindIII - $\alpha 15$ (26-45)
			GCATTACGATGCGGCCGC - GCGTCACAGCAGGTTGATC	配列番 号8	NotI - $\alpha 15$ (1152-1170)
$\alpha 16$	M639 04	ヒト	CGCAAGCTT - GACTGAGGCCACCGCACCAT	配列番 号11	HindIII - $\alpha 16$ (202-221)
			CTCCTTGTTTCGGTT - GCTGCCCTCGGGGC	配列番 号12	αZ (946-960) - $\alpha 16$ (1196-1211)
αZ	NM 0020 73	ヒト	GGCCCCGAGGGCAGC - AACCGAAACAAGGAG	配列番 号13	$\alpha 16$ (1195-1211) - αZ (946-960)
			GCATTACGATGCGGCCGC - AGCTCCTCAGCAAAGGCCA	配列番 号14	NotI - αZ (1068-1086)

【0023】

【実施例2】

<マウス甘味受容体蛋白質発現用ベクターの構築>

【0024】

【実施例2-1】

<T1R1、T1R2及びT1R3 DNAの調製>

野生型C57BL/6マウス16匹より舌組織約2.4gを採取した。常法にしたがって、マウス舌由来のmRNAを含むRNAを調製した。この1 μ gから、12.5pmolのランダムヘキサマーをプライマーとして、常法にしたがい、ストラタジーン製の逆転写酵素である商品名『スーパースクリプトII RT』で、42℃で50分間反応することにより、第1ストランドcDNAを合成した。引き続き、常法にしたがい、リボヌクレアーゼIによりRNAを酵素分解し、PCRの鋳型用のcDNAを得た。次に、マウス由来の甘味受容体T1R1（

配列表における配列番号16)、T1R2(配列表における配列番号17)及びT1R3(配列表における配列番号18)のDNAを得るために、GENBANKデータベースに登録されているDNA配列をもとに、開始コドン付近の塩基配列に制限酵素EcoRI切断部位を付加したセンスプライマー、及び、終始コドン付近の相補塩基配列に制限酵素NotI切断部位を付加したアンチセンスプライマーを作製した。上記cDNA及びPCR用プライマーを用いて、宝酒造株式会社販売の熱耐性DNAポリメラーゼである商品名『LA Taq DNAポリメラーゼ』により、常法にしたがいPCRを行い、5'末端に制限酵素EcoRI切断部位を、3'末端に制限酵素NotI切断部位を有する、T1R1、T1R2及びT1R3をコードするDNAを得た。

【0025】

【実施例2-2】

<甘味受容体発現ベクターの構築>

発現ベクターは、実施例1-3で用いた発現ベクターpEAKS1において、薬剤耐性遺伝子であるピューロマイシン耐性遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子(インビトロジェン社販売の発現ベクターpREP9由来)に組み替えた発現ベクター「pEAKSN1」を常法により作製した。単独発現の場合には、実施例2-1で得たDNAをそれぞれ、制限酵素EcoRI及びNotIで消化し、pEAKSN1のEcoRI及びNotIの位置に常法にしたがってライゲーションし、甘味受容体T1R1、T1R2又はT1R3用の発現ベクターを得た(図2参照)。共発現の場合には、pEAKS2のEcoRI及びNotIの位置にいずれかの甘味受容体を導入した発現ベクターを、制限酵素EcoRVで消化して、プロモーター領域及び甘味受容体蛋白質をコードするDNAを含むDNA断片を調製し、これを甘味受容体蛋白質をコードするDNAを含むpEAKSN1のEcoRV制限酵素切断部位に、常法にしたがってライゲーションし、T1R1及びT1R2共発現ベクター、T1R1及びT1R3共発現ベクター、及びT1R2及びT1R3共発現ベクターを得た。なお、使用したPCR用プライマーの一覧表を表2に示す。

【0026】

【表 2】

甘味受容体	GENBANK アクセス番号	由来	PCR用プライマー	配列表 における配列 番号	備 考
			5' 3'		
T1R1	AY03 2622	マウス	GGAATTC - ATGCTTTTCTGGGCAGCTCACC	配列番号19	EcoRI - T1R1 (1-22)
			GCATTACGATGCGGCCGC - TCAGGTAGTGCCGCAGCGCC	配列番号20	NotI - T1R1 (2510-2529)
T1R2	AY03 2623	マウス	GGAATTC - ATGGGACCCCAGGCGAGGAC	配列番号21	EcoRI - T1R2 (1-20)
			GCATTACGATGCGGCCGC - CTAGCTCTTCCTCATCGTGTAG	配列番号22	NotI - T1R2 (2511-2532)
T1R3	AY03 2621	マウス	GGAATTC - ATGCCAGCTTTGGCTATCATGG	配列番号23	EcoRI - T1R3 (1-22)
			GCATTACGATGCGGCCGC - TCATTCATTGTGTTCTGAGCTG	配列番号24	NotI - T1R3 (2555-2577)

【 0 0 2 7 】

【実施例 3】

＜各種甘味受容体発現細胞の調製＞

実施例 1 - 3 で得た G 蛋白質 $\alpha 15$ 、 $\alpha 16$ / Z キメラ蛋白質（以下、「G 蛋白質 α サブユニット」という）を共発現するベクターを、ヒト胎児腎臓上皮由来 293 細胞株（理研ジーンバンク、RCB No 1637）に、常法のリポフェクション法により遺伝子導入した。導入細胞は、ピューロマイシン（エッジ・バイオシステムズ社販売、商品名『ピューロマイシン』）1 mg / l を含有する 10 % ウシ胎児血清含有のダルベッコ改変最小培地（D-MEM）で細胞濃度 2×10^6 個 / ml で懸濁したのち、プラスチックシャーレで培養した。10 ~ 14 日後、ピューロマイシン耐性の細胞コロニーを回収し、mRNA レベルでの G 蛋白質 α サブユニットの発現を確認して、G 蛋白質 α サブユニット発現細胞株を得た。この細胞に、実施例 2 - 2 で調製した甘味受容体である T1R1、T1R2 又は T1R3 を単独発現用の発現ベクター、T1R1 及び T1R2、T1R1 及び T1R3、又は、T1R2 及び T1R3 を共発現用の発現ベクターを常法のリ

ポフェクション法で遺伝子導入した後、『ピューロマイシン』1mg/l及び『ジェネチシン』500mg/lを含有する10%ウシ胎児血清を有するD-MEMに懸濁し、細胞培養用プラスチックシャーレで培養した後、10～14日後、両薬剤耐性の細胞コロニーを回収し、導入した遺伝子が想定したとおりに発現していることを常法のRT-PCR法により、mRNAレベルでの発現を確認し、G蛋白質と甘味受容体が発現している細胞を得た。なお、対照として、G蛋白質又は甘味受容体遺伝子を含まない発現ベクターのみを導入したものを用意した。

【0028】

【実施例4】

<甘味受容体でのトレハロース及びスクロース反応性テスト>

常法の細胞内カルシウムイオン測定方法にしたがって測定した。すなわち、実施例3で調製したG蛋白質及び甘味受容体を発現している293細胞をプラスチックシャーレでコンフルエント状態まで培養した後、0.05%トリプシン、0.53mM EDTA溶液により剥離させ、10%ウシ胎児血清を含有するD-MEM培地に細胞濃度 1×10^6 個/mlに懸濁し、細胞内カルシウム検出試薬であるモレキュラープローブス社販売の商品名『Fluo-4. AM』を最終濃度2 μ Mとなるように添加し、37℃で30～90分間培養することにより、カルシウム検出試薬『Fluo-4. AM』を細胞内に取り込ませた。これを、10mM HEPES (pH7.4)、130mM塩化ナトリウム、5.4mM塩化カリウム、2mM塩化カルシウム、1mM塩化マグネシウム、5.5mM D-グルコース、0.1%ウシ血清アルブミン、1mMピルビン酸ナトリウムを含有するカルシウムイオン測定用緩衝液で洗浄し、細胞外の試薬を除去し、同緩衝液で細胞濃度 2.67×10^7 個/mlに懸濁し、100 μ mメッシュで濾過し、25℃で30分静置した後、ガラスキューベット（日立製作所（株）販売）に細胞懸濁液を2ml入れ、蛍光分光強度計（日立製作所（株）製造、商品名『HITACHI 650-40』）にセットした。

【0029】

試料の糖質として、トレハロース（片山化学工業（株）販売）、対照として、スクロース（和光純薬工業（株）販売）を、上記のカルシウムイオン測定用緩衝

液で1Mに溶解した。これを上記の細胞懸濁液の入ったガラスキュベットに0.67ml添加し、攪拌した後、励起波長494nm、蛍光波長516nmでの蛍光強度を測定し、反応性の有無を調べた。結果を表3に示す。

【0030】

【表3】

甘味受容体			G蛋白質 αサブ ユニット	カルシウムイオンの 流入	
T1R1	T1R2	T1R3		トレハ ロース	スクロ ース(対 照)
○	—	—	○	無	無
—	○	—	○	無	無
—	—	○	○	有	無
○	○	—	○	無	無
○	—	○	○	有	無
—	○	○	○	有	有
—	—	—	○	無	無
—	○	○	—	無	無

【0031】

表3に示すように、G蛋白質αサブユニット及びT1R3発現細胞において、トレハロースに対する反応性が検出された。一方、対照のスクロースは、G蛋白質αサブユニット、T1R2及びT1R3発現細胞において、反応性が検出された。この結果は、トレハロース受容体においては、T1R1及びT1R2は不要であり、G蛋白質αサブユニットとともにT1R3のみが必要であること、トレハロースとスクロースは異なる受容体により認識されていることが判明した。

【0032】

【実施例5】

<トレハロース受容体における他の甘味成分の検出>

実施例4において、G蛋白質αサブユニットと甘味受容体T1R3のみを発現させた細胞における、各種甘味を有する物質に対する反応性を測定した。すなわ

ち、表4に示す各種甘味物質について、それぞれカルシウムイオンの流入の測定を、実施例4と同様にして行った。結果を表4に示す。

【0033】

【表4】

甘味料	カルシウム の流入
トレハロース	有
スクロース	無
マンノース	無
ガラクトース	無
フルクトース	無
エリスリトール	無
マルチトール	無
レーグリシン	無
アラニン	無
スクラロース	無
アスパルテーム	無

【0034】

表4に示すとおり、トレハロース受容体は、トレハロース以外の糖質には反応性がなく、トレハロースを特異的に認識することが判明した。したがって、各種甘味料が混在する状況下においても、トレハロースを特異的に検出することが可能である。

【0035】

【実施例6】

＜トレハロース受容体におけるトレハロースの定量＞

市販の96穴マイクロプレートに、実施例4で調製した細胞懸濁液0.1mlずつを播種し、これに、実施例4のカルシウムイオン測定用緩衝液により各種濃度に希釈したトレハロース溶液、すなわち、1mM、2mM、5mM、10mM、20mM、50mM、100mM、200mM、500mM、1,000mM、又は2,000mMを0.1mlずつ添加し、濃度マルチプレート用自動蛍光

測定装置（大日本製薬（株）販売、商品名『フルオロスキャンアセントW／DF』）により、励起波長494nm、蛍光波長516nmで測定し、蛍光強度の積分値を算出した。なお、陰性対照はトレハロース無添加の試料を用いた。結果を表5に示す。

【0036】

【表5】

トレハロース濃度(mM)	蛍光強度(積分値)
0	0
1	0.2
2	0.5
5	10
10	19
20	29
50	45
100	82
200	159
500	421
1000	670
2000	720

【0037】

表5に示すように、トレハロース濃度5mM以上から、トレハロースの検出が可能となり、500mMまでは直線性を有していた。したがって、この結果は、トレハロース濃度5mM乃至500mMの範囲内で定量的にトレハロース濃度が測定できることを示している。

【0038】

【発明の効果】

本発明は、哺乳動物における受容体の新規な組み合わせによるトレハロース受容体によって、トレハロースの検出や定量を、簡便に実施できる。また、トレハロースに特異的な受容体を利用しているので、他の糖質、例えばスクロースが混入している試料であっても測定可能である。

【 0 0 3 9 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Trehalose receptor and method of detecting trehalose

<130> 100972

<160> 24

<210> 1

<211> 374

<212> PRT

<213> Human

<300>

<308> GENBANK M80632

<400> 1

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Gly Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu

1 5 10 15

Glu Glu Lys Thr Ala Ala Arg Ile Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu

20 25 30

Leu Glu Gln Lys Lys Gln Glu Arg Glu Glu Leu Lys Leu Leu Leu

35 40 45

Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile

50 55 60

Ile His Gly Val Gly Tyr Ser Glu Glu Asp Arg Arg Ala Phe Arg Leu

65 70 75 80

Leu Ile Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Gln Ala Met Ile Asp Ala

85 90 95

Met Asp Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Asp Ser Lys Gln His

100

105

110

Ala Ser Leu Val Met Thr Gln Asp Pro Tyr Lys Val Ser Thr Phe Glu

115

120

125

Lys Pro Tyr Ala Val Ala Met Gln Tyr Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile

130

135

140

Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala

145

150

155

160

Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Ser Glu Asp Ser Tyr Ile

165

170

175

Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile

180

185

190

Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Lys Lys Thr Lys Leu Arg Ile Val Asp

195

200

205

Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Arg Lys Trp Ile His Cys Phe Glu

210

215

220

Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln

225

230

235

240

Cys Leu Glu Glu Asn Asp Gln Glu Asn Arg Met Glu Glu Ser Leu Ala

245

250

255

Leu Phe Ser Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val

260

265

270

Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Asp Lys Ile His Thr

275

280

285

Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Arg Arg Asp

290

295

300

Ala Glu Ala Ala Lys Ser Phe Ile Leu Asp Met Tyr Ala Arg Val Tyr

305

310

315

320

Ala Ser Cys Ala Glu Pro Gln Asp Gly Gly Arg Lys Gly Ser Arg Ala

325	330	335
Arg Arg Phe Phe Ala His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Ser Val		
340	345	350
Arg Ser Val Phe Lys Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu		
355	360	365
Asp Glu Ile Asn Leu Leu		
370		

<210> 2

<211> 374

<212> PRT

<213> Human

<300>

<308> GENBANK M63904

<400> 2

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu			
1	5	10	15
Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu			
20	25	30	
Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu			
35	40	45	
Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile			
50	55	60	
Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro			
65	70	75	80
Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala			
85	90	95	

Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His
 100 105 110
 Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu
 115 120 125
 Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile
 130 135 140
 Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala
 145 150 155 160
 Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val
 165 170 175
 Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile
 180 185 190
 Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp
 195 200 205
 Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu
 210 215 220
 Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln
 225 230 235 240
 Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala
 245 250 255
 Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val
 260 265 270
 Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr
 275 280 285
 Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp
 290 295 300
 Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr
 305 310 315 320
 Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Lys Lys Gly Ala Arg Ser

325 330 335
 Arg Arg Leu Phe Ser His Tyr Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Ile
 340 345 350
 Arg Lys Val Phe Lys Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu
 355 360 365
 Asp Glu Ile Asn Leu Leu
 370

<210> 3
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Human

<300>
 <308> GENBANK NM_002073

<400> 3
 Met Gly Cys Arg Gln Ser Ser Glu Glu Lys Glu Ala Ala Arg Arg Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ile Asp Arg His Leu Arg Ser Glu Ser Gln Arg Gln Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ile Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ser Asn Ser Gly Lys Ser Thr
 35 40 45
 Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Ser Gly Gly Phe Asn Leu Glu
 50 55 60
 Ala Cys Lys Glu Tyr Lys Pro Leu Ile Ile Tyr Asn Ala Ile Asp Ser
 65 70 75 80
 Leu Thr Arg Ile Ile Arg Ala Leu Ala Ala Leu Arg Ile Asp Phe His
 85 90 95

Asn Pro Asp Arg Ala Tyr Asp Ala Val Gln Leu Phe Ala Leu Thr Gly

100

105

110

Pro Ala Glu Ser Lys Gly Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Gly Val Met

115

120

125

Arg Arg Leu Trp Ala Asp Pro Gly Ala Gln Ala Cys Phe Ser Arg Ser

130

135

140

Ser Glu Tyr His Leu Glu Asp Asn Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu

145

150

155

160

Glu Arg Ile Ala Ala Ala Asp Tyr Ile Pro Thr Val Glu Asp Ile Leu

165

170

175

Arg Ser Arg Asp Met Thr Thr Gly Ile Val Glu Asn Lys Phe Thr Phe

180

185

190

Lys Glu Leu Thr Phe Lys Met Val Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu

195

200

205

Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe

210

215

220

Cys Val Glu Leu Ser Gly Tyr Asp Leu Lys Leu Tyr Glu Asp Asn Gln

225

230

235

240

Thr Ser Arg Met Ala Glu Ser Leu Arg Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn

245

250

255

Asn Asn Trp Phe Ile Asn Thr Ser Leu Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys

260

265

270

Asp Leu Leu Ala Glu Lys Ile Arg Arg Ile Pro Leu Thr Ile Cys Phe

275

280

285

Pro Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Thr Tyr Glu Glu Ala Ala Val Tyr Ile

290

295

300

Gln Arg Gln Phe Glu Asp Leu Asn Arg Asn Lys Glu Thr Lys Glu Ile

305

310

315

320

Tyr Ser His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Ser Asn Ile Gln Phe Val

325

330

335

Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Gln Asn Asn Leu Lys Tyr Ile

340

345

350

Gly Leu Cys

355

<210> 4

<211> 374

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<300>

<301>SEJAL M. MODY, MAURICE K. C. HO, SUSHMA A. JOSHI, and YUNG H. WONG

<302>Incorporation of GalphaZ-Specific Sequence at the Carboxyl Terminus
Increases the Promiscuity of Galpha16 toward Gi-Coupled Receptors

<303>The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

<304>57

<306>13-23

<307>2000

<400> 4

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu

1

5

10

15

Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu

20

25

30

Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu

35

40

45

Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile

50	55	60
Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro		
65	70	75
Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala		80
	85	90
Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His		95
	100	105
Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu		110
	115	120
Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile		125
	130	135
Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala		140
145	150	155
Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val		160
	165	170
Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile		175
	180	185
Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp		190
	195	200
Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu		205
	210	215
Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln		220
225	230	235
Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala		240
	245	250
Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val		255
	260	265
Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr		270

<400> 5

Met Pro Ala Leu Ala Ile Met Gly Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Glu
1 5 10 15

Leu Gly Met Gly Ala Ser Leu Cys Leu Ser Gln Gln Phe Lys Ala Gln
20 25 30

Gly Asp Tyr Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Ser Thr Glu Glu
35 40 45

Ala Thr Leu Asn Gln Arg Thr Gln Pro Asn Ser Ile Pro Cys Asn Arg

50

55

60

Phe Ser Pro Leu Gly Leu Phe Leu Ala Met Ala Met Lys Met Ala Val

65

70

75

80

Glu Glu Ile Asn Asn Gly Ser Ala Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly

85

90

95

Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Thr Met Lys Ser

100

105

110

Ser Leu Met Phe Leu Ala Lys Val Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ala Tyr

115

120

125

Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro

130

135

140

His Ser Ser Glu Leu Ala Leu Ile Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe

145

150

155

160

Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Ser Ala Ser Met Asp Arg Leu Ser Asp

165

170

175

Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val

180

185

190

Gln Leu Gln Ala Val Val Thr Leu Leu Gln Asn Phe Ser Trp Asn Trp

195

200

205

Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Gly Leu Ser

210

215

220

Ile Phe Ser Ser Leu Ala Asn Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu

225

230

235

240

Gly Leu Val Pro Gln His Asp Thr Ser Gly Gln Gln Leu Gly Lys Val

245

250

255

Leu Asp Val Leu Arg Gln Val Asn Gln Ser Lys Val Gln Val Val Val

260

265

270

Leu Phe Ala Ser Ala Arg Ala Val Tyr Ser Leu Phe Ser Tyr Ser Ile

275	280	285
His His Gly Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ser Trp Leu		
290	295	300
Thr Ser Asp Leu Val Met Thr Leu Pro Asn Ile Ala Arg Val Gly Thr		
305	310	315
Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Leu Leu Pro Glu Phe Ser His		
325	330	335
Tyr Val Glu Thr His Leu Ala Leu Ala Ala Asp Pro Ala Phe Cys Ala		
340	345	350
Ser Leu Asn Ala Glu Leu Asp Leu Glu Glu His Val Met Gly Gln Arg		
355	360	365
Cys Pro Arg Cys Asp Asp Ile Met Leu Gln Asn Leu Ser Ser Gly Leu		
370	375	380
Leu Gln Asn Leu Ser Ala Gly Gln Leu His His Gln Ile Phe Ala Thr		
385	390	395
Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln		
405	410	415
Cys Asn Val Ser His Cys His Val Ser Glu His Val Leu Pro Trp Gln		
420	425	430
Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn Met Ser Phe His Ala Arg Asp Leu Thr		
435	440	445
Leu Gln Phe Asp Ala Glu Gly Asn Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys		
450	455	460
Met Trp Val Trp Gln Ser Pro Thr Pro Val Leu His Thr Val Gly Thr		
465	470	475
Phe Asn Gly Thr Leu Gln Leu Gln Gln Ser Lys Met Tyr Trp Pro Gly		
485	490	495
Asn Gln Val Pro Val Ser Gln Cys Ser Arg Gln Cys Lys Asp Gly Gln		
500	505	510

Val Arg Arg Val Lys Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp
 515 520 525
 Cys Lys Ala Gly Ser Tyr Arg Lys His Pro Asp Asp Phe Thr Cys Thr
 530 535 540
 Pro Cys Asn Gln Asp Gln Trp Ser Pro Glu Lys Ser Thr Ala Cys Leu
 545 550 555 560
 Pro Arg Arg Pro Lys Phe Leu Ala Trp Gly Glu Pro Val Val Leu Ser
 565 570 575
 Leu Leu Leu Leu Leu Cys Leu Val Leu Gly Leu Ala Leu Ala Ala Leu
 580 585 590
 Gly Leu Ser Val His His Trp Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly
 595 600 605
 Gly Ser Gln Phe Cys Phe Gly Leu Ile Cys Leu Gly Leu Phe Cys Leu
 610 615 620
 Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Arg Pro Ser Ser Ala Ser Cys Leu Ala
 625 630 635 640
 Gln Gln Pro Met Ala His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu
 645 650 655
 Phe Leu Gln Ala Ala Glu Thr Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser
 660 665 670
 Trp Ala Asn Trp Leu Cys Ser Tyr Leu Arg Gly Leu Trp Ala Trp Leu
 675 680 685
 Val Val Leu Leu Ala Thr Phe Val Glu Ala Ala Leu Cys Ala Trp Tyr
 690 695 700
 Leu Asn Ala Phe Pro Pro Glu Val Val Thr Asp Trp Ser Val Leu Pro
 705 710 715 720
 Thr Glu Val Leu Glu His Cys His Val Arg Ser Trp Val Ser Leu Gly
 725 730 735
 Leu Val His Ile Thr Asn Ala Met Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly

740	745	750
Thr Phe Leu Val Gln Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly		
755	760	765
Leu Thr Phe Ala Met Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Trp Val Ser Phe Val		
770	775	780
Pro Leu Leu Ala Asn Val Gln Val Ala Tyr Gln Pro Ala Val Gln Met		
785	790	795
Gly Ala Ile Leu Val Cys Ala Leu Gly Ile Leu Val Thr Phe His Leu		
805	810	815
Pro Lys Cys Tyr Val Leu Leu Trp Leu Pro Lys Leu Asn Thr Gln Glu		
820	825	830
Phe Phe Leu Gly Arg Asn Ala Lys Lys Ala Ala Asp Glu Asn Ser Gly		
835	840	845
Gly Gly Glu Ala Ala Gln Gly His Asn Glu		
850	855	

<210> 6

<211> 1353

<212> DNA

<213> Mouse

<300>

<308> GENBANK M80632

<400> 6

caggccctgt gatgtcacct ggtggtctgt gaagcgccca cc 42

atg gcc cgg tcc ctg act tgg ggc tgc tgt ccc tgg tgc ctg aca gag 90

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Gly Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu

1	5	10	15	
gag gag aag act gcc gcc aga atc gac cag gag atc aac agg att ttg				138
Glu Glu Lys Thr Ala Ala Arg Ile Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu				
20	25	30		
ttg gaa cag aaa aaa caa gag cgc gag gaa ttg aaa ctc ctg ctg ttg				186
Leu Glu Gln Lys Lys Gln Glu Arg Glu Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu				
35	40	45		
ggg cct ggt gag agc ggg aag agt acg ttc atc aag cag atg cgc atc				234
Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile				
50	55	60		
att cac ggt gtg ggc tac tgc gag gag gac cgc aga gcc ttc cgg ctg				282
Ile His Gly Val Gly Tyr Ser Glu Glu Asp Arg Arg Ala Phe Arg Leu				
65	70	75	80	
ctc atc tac cag aac atc ttc gtc tcc atg cag gcc atg ata gat gcg				330
Leu Ile Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Gln Ala Met Ile Asp Ala				
85	90	95		
atg gac cgg ctg cag atc ccc ttc agc agg cct gac agc aag cag cac				378
Met Asp Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Asp Ser Lys Gln His				
100	105	110		
gcc agc cta gtg atg acc cag gac ccc tat aaa gtg agc aca ttc gag				426
Ala Ser Leu Val Met Thr Gln Asp Pro Tyr Lys Val Ser Thr Phe Glu				
115	120	125		
aag cca tat gca gtg gcc atg cag tac ctg tgg cgg gac gcg ggc atc				474
Lys Pro Tyr Ala Val Ala Met Gln Tyr Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile				
130	135	140		
cgt gca tgc tac gag cga agg cgt gaa ttc cac ctt ctg gac tcc gcg				522
Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala				
145	150	155	160	
gtg tat tac ctg tca cac ctg gag cgc ata tca gag gac agc tac atc				570

Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Ser Glu Asp Ser Tyr Ile	
165 170 175	
ccc act gcg caa gac gtg ctg cgc agt cgc atg ccc acc aca ggc atc	618
Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile	
180 185 190	
aat gag tac tgc ttc tcc gtg aag aaa acc aaa ctg cgc atc gtg gat	666
Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Lys Lys Thr Lys Leu Arg Ile Val Asp	
195 200 205	
gtt ggt ggc cag agg tca gag cgt agg aaa tgg att cac tgt ttc gag	714
Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Arg Lys Trp Ile His Cys Phe Glu	
210 215 220	
aac gtg att gcc ctc atc tac ctg gcc tcc ctg agc gag tat gac cag	762
Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln	
225 230 235 240	
tgc cta gag gag aac gat cag gag aac cgc atg gag gag agt ctc gct	810
Cys Leu Glu Glu Asn Asp Gln Glu Asn Arg Met Glu Glu Ser Leu Ala	
245 250 255	
ctg ttc agc acg atc cta gag ctg ccc tgg ttc aag agc acc tcg gtc	858
Leu Phe Ser Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val	
260 265 270	
atc ctc ttc ctc aac aag acg gac atc ctg gaa gat aag att cac acc	906
Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Asp Lys Ile His Thr	
275 280 285	
tcc cac ctg gcc aca tac ttc ccc agc ttc cag gga ccc cgg cga gac	954
Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Arg Arg Asp	
290 295 300	
gca gag gcc gcc aag agc ttc atc ttg gac atg tat gcg cgc gtg tac	1002
Ala Glu Ala Ala Lys Ser Phe Ile Leu Asp Met Tyr Ala Arg Val Tyr	
305 310 315 320	

gcg agc tgc gca gag ccc cag gac ggt ggc agg aaa ggc tcc cgc gcg 1050

Ala Ser Cys Ala Glu Pro Gln Asp Gly Gly Arg Lys Gly Ser Arg Ala

325

330

335

cgc cgc ttc ttc gca cac ttc acc tgt gcc acg gac acg caa agc gtc 1098

Arg Arg Phe Phe Ala His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Ser Val

340

345

350

cgc agc gtg ttc aag gac gtg cgg gac tcg gtg ctg gcc cgg tac ctg 1146

Arg Ser Val Phe Lys Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu

355

360

365

gac gag atc aac ctg ctg

1164

Asp Glu Ile Asn Leu Leu

370

tgacgcggga caggaaccc caagcgcgac gcgtcgtggc gaggacatac ctccccctgg 1224

tggccgcgcg tggaactgca ggtccaggag ctgccaagtg gggaagccag cccacaggag 1284

agagtcctgc ttctactggg cccaagcca gtcctgtaa ttattcctcg ccttctctag 1344

tgttggaag

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

cgcaagcttt ctctgtgaag cgcccaccat g

<210> 8

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gcattacgat gcggccgcgc gtcacagcag gttgac

<210> 9

<211> 2060

<212> DNA

<213> Human

<300>

<308> GENBANK M63904

<400>

```

tggtcccagc actcaagcct tgccaccgcc gagccgggct tcctgggtgt ttcaggcaag   60
gaagtctagg tccctggggg gtgaccccca aggaaaaggc agcctccctg cgcacccggt   120
tgcccgggagc cctctccagg gccggctggg ctgggggttg ccctggccag caggggcccg   180
ggggcgatgc cacccggtgc cgactgaggc caccgcacc                               219
atg gcc cgc tcg ctg acc tgg cgc tgc tgc ccc tgg tgc ctg acg gag       267
Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu
    1           5           10          15
gat gag aag gcc gcc gcc cgg gtg gac cag gag atc aac agg atc ctc       315
Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu
          20           25           30
ttg gag cag aag aag cag gac cgc ggg gag ctg aag ctg ctg ctt ttg       363
Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu
        35           40           45
ggc cca ggc gag agc ggg aag agc acc ttc atc aag cag atg cgg atc       411
Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile

```

50	55	60	
atc cac ggc gcc ggc tac tcg gag gag gag cgc aag ggc ttc cgg ccc			459
Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro			
65	70	75	80
ctg gtc tac cag aac atc ttc gtg tcc atg cgg gcc atg atc gag gcc			507
Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala			
85	90	95	
atg gag cgg ctg cag att cca ttc agc agg ccc gag agc aag cac cac			555
Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His			
100	105	110	
gct agc ctg gtc atg agc cag gac ccc tat aaa gtg acc acg ttt gag			603
Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu			
115	120	125	
aag cgc tac gct gcg gcc atg cag tgg ctg tgg agg gat gcc ggc atc			651
Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile			
130	135	140	
cgg gcc tgc tat gag cgt cgg cgg gaa ttc cac ctg ctc gat tca gcc			669
Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala			
145	150	155	160
gtg tac tac ctg tcc cac ctg gag cgc atc acc gag gag ggc tac gtc			747
Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val			
165	170	175	
ccc aca gct cag gac gtg ctc cgc agc cgc atg ccc acc act ggc atc			795
Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile			
180	185	190	
aac gag tac tgc ttc tcc gtg cag aaa acc aac ctg cgg atc gtg gac			843
Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp			
195	200	205	
gtc ggg ggc cag aag tca gag cgt aag aaa tgg atc cat tgt ttc gag			891

Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu
 210 215 220
 aac gtg atc gcc ctc atc tac ctg gcc tca ctg agt gaa tac gac cag 939
 Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln
 225 230 235 240
 tgc ctg gag gag aac aac cag gag aac cgc atg aag gag agc ctc gca 987
 Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala
 245 250 255
 ttg ttt ggg act atc ctg gaa cta ccc tgg ttc aaa agc aca tcc gtc 1035
 Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val
 260 265 270
 atc ctc ttt ctc aac aaa acc gac atc ctg gag gag aaa atc ccc acc 1083
 Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr
 275 280 285
 tcc cac ctg gct acc tat ttc ccc agt ttc cag ggc cct aag cag gat 1131
 Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp
 290 295 300
 gct gag gca gcc aag agg ttc atc ctg gac atg tac acg agg atg tac 1179
 Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr
 305 310 315 320
 acc ggg tgc gtg gac ggc ccc gag ggc agc aag aag ggc gca cga tcc 1227
 Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Lys Lys Gly Ala Arg Ser
 325 330 335
 cga cgc ctt ttc agc cac tac aca tgt gcc aca gac aca cag aac atc 1275
 Arg Arg Leu Phe Ser His Tyr Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Ile
 340 345 350
 cgc aag gtc ttc aag gac gtg cgg gac tcg gtg ctc gcc cgc tac ctg 1323
 Arg Lys Val Phe Lys Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu
 355 360 365

gac gag atc aac ctg ctg

1341

Asp Glu Ile Asn Leu Leu

370

tgaccaggc cccacctggg gcaggcggca ccggcgggcg ggtgggaggt gggagtggct 1401

gcagggaccc tagtgtcctg gtctatctct ccagcctcgg cccacacgca agggagtgcg 1461

gggacggccc gctgctggcc gctctcttct ctgcctctca ccaggacagc cgccccccag 1521

ggtactcctg cccttgcttg actcagtttc cctcctttga aagggaagga gcaaaacggc 1581

catttgggat gccagggtgg atgaaaaggt gaagaaatca ggggattgag acttgggtgg 1641

gtgggcatct ctcaggagcc ccattctcgg gcgtgtcacc tcctgggcag ggttctggga 1701

ccctctgtgg gtgacgcaca ccctgggatg gggctagtag agccttcagg cgccttcggg 1761

cgtggactct ggcgactct agtggacagg agaaggaacg ccttcagga acctgtggac 1821

taggggtgca gggacttccc ttgcaagg gtaacagacc gctggaaaac actgtcactt 1881

tcagagctcg gtggctcaca gcgtgtcctg ccccggttg cggacgagag aaatcgcggc 1941

ccacaagcat ccccatccc ttgcaggctg ggggctgggc atgctgcac ttaacctttt 2001

gtatttattt cctcaccttc tgcagggtc cggtcgggct gaaattaaag atttcttag 2060

<210> 10

<211> 2679

<212> DNA

<213> Human

<300>

<308> GENBANK NM_002073

<400> 10

gagaccagga cc

12

atg gga tgt cgg caa agc tca gag gaa aaa gaa gca gcc cgg cgg tcc

60

Met Gly Cys Arg Gln Ser Ser Glu Glu Lys Glu Ala Ala Arg Arg Ser

1

5

10

15

cgg aga att gac cgc cac ctg cgc tca gag agc cag cgg caa cgc cgc 108
 Arg Arg Ile Asp Arg His Leu Arg Ser Glu Ser Gln Arg Gln Arg Arg
 20 25 30
 gaa atc aag ctg ctc ctg ctg ggc acc agc aac tca ggc aag agc acc 156
 Glu Ile Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ser Asn Ser Gly Lys Ser Thr
 35 40 45
 atc gtc aaa cag atg aag atc atc cac agc ggc ggc ttc aac ctg gag 204
 Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Ser Gly Gly Phe Asn Leu Glu
 50 55 60
 gcc tgc aag gag tac aag ccc ctc atc atc tac aat gcc atc gac tcg 252
 Ala Cys Lys Glu Tyr Lys Pro Leu Ile Ile Tyr Asn Ala Ile Asp Ser
 65 70 75 80
 ctg acc cgc atc atc cgg gcc ctg gcc gcc ctc agg atc gac ttc cac 300
 Leu Thr Arg Ile Ile Arg Ala Leu Ala Ala Leu Arg Ile Asp Phe His
 85 90 95
 aac ccc gac cgc gcc tac gac gct gtg cag ctc ttt gcg ctg acg ggc 348
 Asn Pro Asp Arg Ala Tyr Asp Ala Val Gln Leu Phe Ala Leu Thr Gly
 100 105 110
 ccc gct gag agc aag ggc gag atc aca ccc gag ctg ctg ggt gtc atg 396
 Pro Ala Glu Ser Lys Gly Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Gly Val Met
 115 120 125
 cga cgg ctc tgg gcc gac cca ggg gca cag gcc tgc ttc agc cgc tcc 444
 Arg Arg Leu Trp Ala Asp Pro Gly Ala Gln Ala Cys Phe Ser Arg Ser
 130 135 140
 agc gag tac cac ctg gag gac aac gcg gcc tac tac ctg aac gac ctg 492
 Ser Glu Tyr His Leu Glu Asp Asn Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu
 145 150 155 160
 gag cgc atc gcc gca gct gac tat atc ccc act gtc gag gac atc ctg 540
 Glu Arg Ile Ala Ala Ala Asp Tyr Ile Pro Thr Val Glu Asp Ile Leu

165	170	175	
cgc tcc cgg gac atg acc acg ggc att gtg gag aac aag ttc acc ttc			588
Arg Ser Arg Asp Met Thr Thr Gly Ile Val Glu Asn Lys Phe Thr Phe			
180	185	190	
aag gag ctc acc ttc aag atg gtg gac gtg ggg ggg cag agg tca gag			636
Lys Glu Leu Thr Phe Lys Met Val Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu			
195	200	205	
cgc aaa aag tgg atc cac tgc ttc gag ggc gtc aca gcc atc atc ttc			684
Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe			
210	215	220	
tgt gtg gag ctc agc ggc tac gac ctg aaa ctc tac gag gat aac cag			732
Cys Val Glu Leu Ser Gly Tyr Asp Leu Lys Leu Tyr Glu Asp Asn Gln			
225	230	235	240
aca agt cgg atg gca gag agc ttg cgc ctc ttt gac tcc atc tgc aac			780
Thr Ser Arg Met Ala Glu Ser Leu Arg Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn			
245	250	255	
aac aac tgg ttc atc aac acc tca ctc atc ctc ttc ctg aac aag aag			828
Asn Asn Trp Phe Ile Asn Thr Ser Leu Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys			
260	265	270	
gac ctg ctg gca gag aag atc cgc cgc atc ccg ctc acc atc tgc ttt			876
Asp Leu Leu Ala Glu Lys Ile Arg Arg Ile Pro Leu Thr Ile Cys Phe			
275	280	285	
ccc gag tac aag ggc cag aac acg tac gag gag gcc gct gtc tac atc			924
Pro Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Thr Tyr Glu Glu Ala Ala Val Tyr Ile			
290	295	300	
cag cgg cag ttt gaa gac ctg aac cgc aac aag gag acc aag gag atc			972
Gln Arg Gln Phe Glu Asp Leu Asn Arg Asn Lys Glu Thr Lys Glu Ile			
305	310	315	320
tac tcc cac ttc acc tgc gcc acc gac acc agt aac atc cag ttt gtc			1020

Tyr Ser His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Ser Asn Ile Gln Phe Val

325

330

335

ttc gac gcg gtg aca gac gtc atc ata cag aac aat ctc aag tac att 1068

Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Gln Asn Asn Leu Lys Tyr Ile

340

345

350

ggc ctt tgc

1077

Gly Leu Cys

355

tgaggagctg ggcccggggc gcctgcctat ggtgaaaccc acgggggtgtc atgccccaac 1137

gcgtgctaga gaggcccaat ccaggggcag aaaacagggg gcctaaagaa tgtccccac 1197

cccttggcct ctgcctcctt ggccccacat ttctgcaaac ataaatattt acggatagat 1257

tgctaggtag atagacacac acacatgcac acacacacat ctggagatgg caaaatcctc 1317

taaaatgtcg aggtctcttg aagacttgag aagctgtcac aaggtcacta caagcccaac 1377

ctgccccctt actttgcctt cctgagttgg cccactcca cttgggggtc tgcattggat 1437

tgttagggat aggcagcagg gctgaggcaa ggtaggcaa ctgcaccct gtcacctgga 1497

ggagggccgg ctgcgtgcc gagctctggc ctagggacct tgccgctgac caagaggag 1557

gaccagtga gggctctgtgc accttcctg ctggcctgca cacagctgct cagcaccatt 1617

tcattctgga cctgggacct taggagccgg gtgacagcac taaccagacc tccagccact 1677

cacagctctt tttaaaaaac agcttcaaaa tatgcagcaa aaaccaatac aacaaaacga 1737

gtggcacgat ttatttcaaa ctaggccagc tgggattcca gcttttctt tactagtctg 1797

atgttttata aatcaaaacc tggttttcct tctctggcat tttttttgt ttttgtttt 1857

ttggtttttt ttttttttt ggccaaatct cgtgggtgtt cgcagaaaaa aatccagaaa 1917

atttcaaag cagttgagta ttctttttta aatgcagatt ttcaaaacat attttttttc 1977

aggtggctct ttttgtgtct ggcttgctga gtgtaaaagt tgttatctgg acgatctgtc 2037

tctctgctcc aaagaaattt tggagtgagt ggcagtcctg cgccagcctc gcgggacacg 2097

tgttgtacat aagcctctgc agtgtcctct tgtaaatggg ggggttttct gctttgtttt 2157

tatttaagaa aataaacacg acatatTTaa agaaggttct ttacactggg agcaaatgaa 2217

caatagctaa gtgtcttggg atttaaagag taaattattt gtggctttgc tgagtgaagg 2277

aaggggagca aggggtggtg cccctggtcc cagcatgccc cgcgcctgag actggctgga 2337
aatgctctga ctctgtgaa ggcacagcca gcgttggtgc ctgagggagg ccctgctggg 2397
accctgatct gggccttcct gtcccagggc ctatgggcaa ctgcgttgaa aggacgttcg 2457
ccaagggccg tgtgtaaata cgaactgcgc catggagagg agaggcactg ccggagccct 2517
tgccagatct ccctccctct ctctgtgcag tagctgtgtg tccgaggtca gtgtgcggaa 2577
tcacagccaa ggacgtgaag agatgtacgg gggaaagaga agctggggat tggatgaaag 2637
tcaaaggttg tctactttaa gaaaataaaa taccctgaat gg

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

cgcaagcttg actgaggcca ccgcaccat

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

ctccttgttt cggttgctgc cctcggggc

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

ggccccgagg gcagcaaccg aaacaaggag

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

gcattacgat gcggccgcag ctctcagca aaggcca

<210> 15

<211> 1122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<300>

<301>SEJAL M. MODY, MAURICE K. C. HO, SUSHMA A. JOSHI, and YUNG H. WONG

<302>Incorporation of GalphaZ-Specific Sequence at the Carboxyl Terminus
Increases the Promiscuity of Galpha16 toward Gi-Coupled Receptors

<303>The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

<304>57

<306>13-23

<307>2000

<400> 15

atg gcc cgc tcg ctg acc tgg cgc tgc tgc ccc tgg tgc ctg acg gag 48

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu

1

5

10

15

gat gag aag gcc gcc gcc cgg gtg gac cag gag atc aac agg atc ctc 96

Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu	
20 25 30	
ttg gag cag aag aag cag gac cgc ggg gag ctg aag ctg ctg ctt ttg	144
Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu	
35 40 45	
ggc cca ggc gag agc ggg aag agc acc ttc atc aag cag atg cgg atc	192
Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile	
50 55 60	
atc cac ggc gcc ggc tac tcg gag gag gag cgc aag ggc ttc cgg ccc	240
Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro	
65 70 75 80	
ctg gtc tac cag aac atc ttc gtg tcc atg cgg gcc atg atc gag gcc	288
Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala	
85 90 95	
atg gag cgg ctg cag att cca ttc agc agg ccc gag agc aag cac cac	336
Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His	
100 105 110	
gct agc ctg gtc atg agc cag gac ccc tat aaa gtg acc acg ttt gag	384
Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu	
115 120 125	
aag cgc tac gct gcg gcc atg cag tgg ctg tgg agg gat gcc ggc atc	432
Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile	
130 135 140	
cgg gcc tgc tat gag cgt cgg cgg gaa ttc cac ctg ctc gat tca gcc	480
Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala	
145 150 155 160	
gtg tac tac ctg tcc cac ctg gag cgc atc acc gag gag ggc tac gtc	528
Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val	
165 170 175	

ccc aca gct cag gac gtg ctc cgc agc cgc atg ccc acc act ggc atc 576
 Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile
 180 185 190
 aac gag tac tgc ttc tcc gtg cag aaa acc aac ctg cgg atc gtg gac 624
 Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp
 195 200 205
 gtc ggg ggc cag aag tca gag cgt aag aaa tgg atc cat tgt ttc gag 672
 Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu
 210 215 220
 aac gtg atc gcc ctc atc tac ctg gcc tca ctg agt gaa tac gac cag 720
 Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln
 225 230 235 240
 tgc ctg gag gag aac aac cag gag aac cgc atg aag gag agc ctc gca 768
 Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala
 245 250 255
 ttg ttt ggg act atc ctg gaa cta ccc tgg ttc aaa agc aca tcc gtc 816
 Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val
 260 265 270
 atc ctc ttt ctc aac aaa acc gac atc ctg gag gag aaa atc ccc acc 864
 Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr
 275 280 285
 tcc cac ctg gct acc tat ttc ccc agt ttc cag ggc cct aag cag gat 912
 Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp
 290 295 300
 gct gag gca gcc aag agg ttc atc ctg gac atg tac acg agg atg tac 960
 Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr
 305 310 315 320
 acc ggg tgc gtg gac ggc ccc gag ggc agc aac cgc aac aag gag acc 1008
 Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Asn Arg Asn Lys Glu Thr

325 330 335
aag gag atc tac tcc cac ttc acc tgc gcc acc gac acc agt aac atc 1056
Lys Glu Ile Tyr Ser His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Ser Asn Ile

340 345 350
cag ttt gtc ttc gac gcg gtg aca gac gtc atc ata cag aac aat ctc 1104
Gln Phe Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Gln Asn Asn Leu

355 360 365
aag tac att ggc ctt tgc
Lys Tyr Ile Gly Leu Cys

370

<210> 16

<211> 2529

<212> DNA

<213> Mouse

<300>

<308>GENBANK AY032622

<400> 16

atg ctt ttc tgg gca gct cac ctg ctg ctc agc ctg cag ctg gcc gtt 48
Met Leu Phe Trp Ala Ala His Leu Leu Leu Ser Leu Gln Leu Ala Val

1 5 10 15
gct tac tgc tgg gct ttc agc tgc caa agg aca gaa tcc tct cca ggt 96
Ala Tyr Cys Trp Ala Phe Ser Cys Gln Arg Thr Glu Ser Ser Pro Gly

20 25 30
ttc agc ctc cct ggg gac ttc ctc ctg gca ggc ctg ttc tcc ctc cat 144
Phe Ser Leu Pro Gly Asp Phe Leu Leu Ala Gly Leu Phe Ser Leu His

35 40 45

gct gac tgt ctg cag gtg aga cac aga cct ctg gtg aca agt tgt gac 192
 Ala Asp Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Leu Val Thr Ser Cys Asp
 50 55 60
 agg tct gac agc ttc aac ggc cat ggc tat cac ctc ttc caa gcc atg 240
 Arg Ser Asp Ser Phe Asn Gly His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met
 65 70 75 80
 cgg ttc acc gtt gag gag ata aac aac tcc aca gct ctg ctt ccc aac 288
 Arg Phe Thr Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Thr Ala Leu Leu Pro Asn
 85 90 95
 atc acc ctg ggg tat gaa ctg tat gac gtg tgc tca gag tct tcc aat 336
 Ile Thr Leu Gly Tyr Glu Leu Tyr Asp Val Cys Ser Glu Ser Ser Asn
 100 105 110
 gtc tat gcc acc ctg agg gtg ccc gcc cag caa ggg aca ggc cac cta 384
 Val Tyr Ala Thr Leu Arg Val Pro Ala Gln Gln Gly Thr Gly His Leu
 115 120 125
 gag atg cag aga gat ctt cgc aac cac tcc tcc aag gtg gtg gca ctc 432
 Glu Met Gln Arg Asp Leu Arg Asn His Ser Ser Lys Val Val Ala Leu
 130 135 140
 att ggg cct gat aac act gac cac gct gtc acc act gct gcc ctg ctg 480
 Ile Gly Pro Asp Asn Thr Asp His Ala Val Thr Thr Ala Ala Leu Leu
 145 150 155 160
 agc cct ttt ctg atg ccc ctg gtc agc tat gag gcg agc agc gtg atc 528
 Ser Pro Phe Leu Met Pro Leu Val Ser Tyr Glu Ala Ser Ser Val Ile
 165 170 175
 ctc agt ggg aag cgc aag ttc ccg tcc ttc ttg cgc acc atc ccc agc 576
 Leu Ser Gly Lys Arg Lys Phe Pro Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Ser
 180 185 190
 gat aag tac cag gtg gaa gtc ata gtg cgg ctg ctg cag agc ttc ggc 624

Asp Lys Tyr Gln Val Glu Val Ile Val Arg Leu Leu Gln Ser Phe Gly	
195	200
tgg gtc tgg atc tcg ctc gtt ggc agc tat ggt gac tac ggg cag ctg	672
Trp Val Trp Ile Ser Leu Val Gly Ser Tyr Gly Asp Tyr Gly Gln Leu	
210	215
ggc gta cag gcg ctg gag gag ctg gcc act cca cgg ggc atc tgc gtc	720
Gly Val Gln Ala Leu Glu Glu Leu Ala Thr Pro Arg Gly Ile Cys Val	
225	230
gcc ttc aag gac gtg gtg cct ctc tcc gcc cag gcg ggt gac cca agg	768
Ala Phe Lys Asp Val Val Pro Leu Ser Ala Gln Ala Gly Asp Pro Arg	
245	250
atg cag cgc atg atg ctg cgt ctg gct cga gcc agg acc acc gtg gtc	816
Met Gln Arg Met Met Leu Arg Leu Ala Arg Ala Arg Thr Thr Val Val	
260	265
gtg gtc ttc tct aac cgg cac ctg gct gga gtg ttc ttc agg tct gtg	864
Val Val Phe Ser Asn Arg His Leu Ala Gly Val Phe Phe Arg Ser Val	
275	280
gtg ctg gcc aac ctg act ggc aaa gtg tgg atc gcc tcc gaa gac tgg	912
Val Leu Ala Asn Leu Thr Gly Lys Val Trp Ile Ala Ser Glu Asp Trp	
290	295
gcc atc tcc acg tac atc acc aat gtg ccc ggg atc cag ggc att ggg	960
Ala Ile Ser Thr Tyr Ile Thr Asn Val Pro Gly Ile Gln Gly Ile Gly	
305	310
acg gtg ctg ggg gtg gcc atc cag cag aga caa gtc cct ggc ctg aag	1008
Thr Val Leu Gly Val Ala Ile Gln Gln Arg Gln Val Pro Gly Leu Lys	
325	330
gag ttt gaa gag tcc tat gtc cag gca gtg atg ggt gct ccc aga act	1056
Glu Phe Glu Glu Ser Tyr Val Gln Ala Val Met Gly Ala Pro Arg Thr	
340	345
	350

tgc cca gag ggg tcc tgg tgc ggc act aac cag ctg tgc agg gag tgt	1104
Cys Pro Glu Gly Ser Trp Cys Gly Thr Asn Gln Leu Cys Arg Glu Cys	
355 360 365	
cac gct ttc acg aca tgg aac atg ccc gag ctt gga gcc ttc tcc atg	1152
His Ala Phe Thr Thr Trp Asn Met Pro Glu Leu Gly Ala Phe Ser Met	
370 375 380	
agc gct gcc tac aat gtg tat gag gct gtg tat gct gtg gcc cac ggc	1200
Ser Ala Ala Tyr Asn Val Tyr Glu Ala Val Tyr Ala Val Ala His Gly	
385 390 395 400	
ctc cac cag ctc ctg gga tgt acc tct ggg acc tgt gcc aga ggc cca	1248
Leu His Gln Leu Leu Gly Cys Thr Ser Gly Thr Cys Ala Arg Gly Pro	
405 410 415	
gtc tac ccc tgg cag ctt ctt cag cag atc tac aag gtg aat ttc ctt	1296
Val Tyr Pro Trp Gln Leu Leu Gln Gln Ile Tyr Lys Val Asn Phe Leu	
420 425 430	
cta cat aag aag act gta gca ttc gat gac aag ggg gac cct cta ggt	1344
Leu His Lys Lys Thr Val Ala Phe Asp Asp Lys Gly Asp Pro Leu Gly	
435 440 445	
tat tat gac atc atc gcc tgg gac tgg aat gga cct gaa tgg acc ttt	1392
Tyr Tyr Asp Ile Ile Ala Trp Asp Trp Asn Gly Pro Glu Trp Thr Phe	
450 455 460	
gag gtc att ggt tct gcc tca ctg tct cca gtt cat cta gac ata aat	1440
Glu Val Ile Gly Ser Ala Ser Leu Ser Pro Val His Leu Asp Ile Asn	
465 470 475 480	
aag aca aaa atc cag tgg cac ggg aag aac aat cag gtg cct gtg tca	1488
Lys Thr Lys Ile Gln Trp His Gly Lys Asn Asn Gln Val Pro Val Ser	
485 490 495	
gtg tgt acc agg gac tgt ctc gaa ggg cac cac agg ttg gtc atg ggt	1536
Val Cys Thr Arg Asp Cys Leu Glu Gly His His Arg Leu Val Met Gly	

500	505	510	
tcc cac cac tgc tgc ttc gag tgc atg ccc tgt gaa gct ggg aca ttt			1584
Ser His His Cys Cys Phe Glu Cys Met Pro Cys Glu Ala Gly Thr Phe			
515	520	525	
ctc aac acg agt gag ctt cac acc tgc cag cct tgt gga aca gaa gaa			1632
Leu Asn Thr Ser Glu Leu His Thr Cys Gln Pro Cys Gly Thr Glu Glu			
530	535	540	
tgg gcc cct gag ggg agc tca gcc tgc ttc tca cgc acc gtg gag ttc			1680
Trp Ala Pro Glu Gly Ser Ser Ala Cys Phe Ser Arg Thr Val Glu Phe			
545	550	555	560
ttg ggg tgg cat gaa ccc atc tct ttg gtg cta tta gca gct aac acg			1728
Leu Gly Trp His Glu Pro Ile Ser Leu Val Leu Leu Ala Ala Asn Thr			
565	570	575	
cta ttg ctg ctg ctg ctg att ggg act gct ggc ctg ttt gcc tgg cgt			1776
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp Arg			
580	585	590	
ctt cac acg cct gtt gtg agg tca gct ggg ggt agg ctg tgc ttc ctc			1824
Leu His Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu			
595	600	605	
atg ctg ggt tcc ttg gta gct ggg agt tgc agc ctc tac agc ttc ttc			1872
Met Leu Gly Ser Leu Val Ala Gly Ser Cys Ser Leu Tyr Ser Phe Phe			
610	615	620	
ggg aag ccc acg gtg ccc gcg tgc ttg ctg cgt cag ccc ctc ttt tct			1920
Gly Lys Pro Thr Val Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Pro Leu Phe Ser			
625	630	635	640
ctc ggg ttt gcc att ttc ctc tcc tgt ctg aca atc cgc tcc ttc caa			1968
Leu Gly Phe Ala Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Ile Arg Ser Phe Gln			
645	650	655	
ctg gtc atc atc ttc aag ttt tct acc aag gta ccc aca ttc tac cac			2016

Leu Val Ile Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His	
660	665 670
act tgg gcc caa aac cat ggt gcc gga ata ttc gtc att gtc agc tcc	2064
Thr Trp Ala Gln Asn His Gly Ala Gly Ile Phe Val Ile Val Ser Ser	
675	680 685
acg gtc cat ttg ttc ctc tgt ctc acg tgg ctt gca atg tgg acc cca	2112
Thr Val His Leu Phe Leu Cys Leu Thr Trp Leu Ala Met Trp Thr Pro	
690	695 700
cgg ccc acc agg gag tac cag cgc ttc ccc cat ctg gtg att ctt gag	2160
Arg Pro Thr Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Ile Leu Glu	
705	710 715 720
tgc aca gag gtc aac tct gtg ggc ttc ctg gtg gct ttc gca cac aac	2208
Cys Thr Glu Val Asn Ser Val Gly Phe Leu Val Ala Phe Ala His Asn	
725	730 735
atc ctc ctc tcc atc agc acc ttt gtc tgc agc tac ctg ggt aag gaa	2256
Ile Leu Leu Ser Ile Ser Thr Phe Val Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Glu	
740	745 750
ctg ccg gag aac tat aac gaa gcc aaa tgt gtc acc ttc agc ctg ctc	2304
Leu Pro Glu Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu	
755	760 765
ctc cac ttc gta tcc tgg atc gct ttc ttc acc atg tcc agc att tac	2352
Leu His Phe Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Met Ser Ser Ile Tyr	
770	775 780
cag ggc agc tac cta ccc gcg gtc aat gtg ctg gca ggg ctg gcc act	2400
Gln Gly Ser Tyr Leu Pro Ala Val Asn Val Leu Ala Gly Leu Ala Thr	
785	790 795 800
ctg agt ggc ggc ttc agc ggc tat ttc ctc cct aaa tgc tac gtg att	2448
Leu Ser Gly Gly Phe Ser Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile	
805	810 815

ctc tgc cgt cca gaa ctc aac aac aca gaa cac ttt cag gcc tcc atc 2496

Leu Cys Arg Pro Glu Leu Asn Asn Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile

820

825

830

cag gac tac acg agg cgc tgc ggc act acc tga

Gln Asp Tyr Thr Arg Arg Cys Gly Thr Thr

835

840

<210> 17

<211> 2532

<212> DNA

<213> mouse

<300>

<308>GENBANK AY032623

<400> 17

atg gga ccc cag gcg agg aca ctc cat ttg ctg ttt ctc ctg ctg cat 48

Met Gly Pro Gln Ala Arg Thr Leu His Leu Leu Phe Leu Leu Leu His

1

5

10

15

gct ctg cct aag cca gtc atg ctg gta ggg aac tcc gac ttt cac ctg 96

Ala Leu Pro Lys Pro Val Met Leu Val Gly Asn Ser Asp Phe His Leu

20

25

30

gct ggg gac tac ctc ctg ggt ggc ctc ttt acc ctc cat gcc aac gtg 144

Ala Gly Asp Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Thr Leu His Ala Asn Val

35

40

45

aag agt gtc tct cac ctc agc tac ctg cag gtg ccc aag tgc aat gag 192

Lys Ser Val Ser His Leu Ser Tyr Leu Gln Val Pro Lys Cys Asn Glu

50

55

60

tac aac atg aag gtg ttg ggc tac aac ctc atg cag gcc atg cga ttc 240



370	375	380	
ggg gag cgt gtg gtc tac agc gtg tac tcg gcc gtc tac gcg gtg gcc	1200		
Gly Glu Arg Val Val Tyr Ser Val Tyr Ser Ala Val Tyr Ala Val Ala			
385	390	395	400
cac acc ctc cac aga ctc ctc cac tgc aat cag gtc cgc tgc acc aag	1248		
His Thr Leu His Arg Leu Leu His Cys Asn Gln Val Arg Cys Thr Lys			
405	410	415	
caa atc gtc tat cca tgg cag cta ctc agg gag atc tgg cat gtc aac	1296		
Gln Ile Val Tyr Pro Trp Gln Leu Leu Arg Glu Ile Trp His Val Asn			
420	425	430	
ttc acg ctc ctg ggc aac cag ctc ttc ttc gac gaa caa ggg gac atg	1344		
Phe Thr Leu Leu Gly Asn Gln Leu Phe Phe Asp Glu Gln Gly Asp Met			
435	440	445	
ccg atg ctc ctg gac atc atc cag tgg cag tgg ggc ctg agc cag aac	1392		
Pro Met Leu Leu Asp Ile Ile Gln Trp Gln Trp Gly Leu Ser Gln Asn			
450	455	460	
ccc ttc caa agc atc gcc tcc tac tcc ccc acc gag acg agg ctg acc	1440		
Pro Phe Gln Ser Ile Ala Ser Tyr Ser Pro Thr Glu Thr Arg Leu Thr			
465	470	475	480
tac att agc aat gtg tcc tgg tac acc ccc aac aac acg gtc ccc ata	1488		
Tyr Ile Ser Asn Val Ser Trp Tyr Thr Pro Asn Asn Thr Val Pro Ile			
485	490	495	
tcc atg tgt tct aag agt tgc cag cct ggg caa atg aaa aaa ccc ata	1536		
Ser Met Cys Ser Lys Ser Cys Gln Pro Gly Gln Met Lys Lys Pro Ile			
500	505	510	
ggc ctc cac cca tgc tgc ttc gag tgt gtg gac tgt ccg ccg gac acc	1584		
Gly Leu His Pro Cys Cys Phe Glu Cys Val Asp Cys Pro Pro Asp Thr			
515	520	525	
tac ctc aac cga tca gta gat gag ttt aac tgt ctg tcc tgc ccg ggt	1632		

Tyr	Leu	Asn	Arg	Ser	Val	Asp	Glu	Phe	Asn	Cys	Leu	Ser	Cys	Pro	Gly		
530						535					540						
tcc	atg	tgg	tct	tac	aag	aac	aac	atc	gct	tgc	ttc	aag	cgg	cgg	ctg	1680	
Ser	Met	Trp	Ser	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ile	Ala	Cys	Phe	Lys	Arg	Arg	Leu		
545					550					555					560		
gcc	ttc	ctg	gag	tgg	cac	gaa	gtg	ccc	act	atc	gtg	gtg	acc	atc	ctg	1728	
Ala	Phe	Leu	Glu	Trp	His	Glu	Val	Pro	Thr	Ile	Val	Val	Thr	Ile	Leu		
				565						570					575		
gcc	gcc	ctg	ggc	ttc	atc	agt	acg	ctg	gcc	att	ctg	ctc	atc	ttc	tgg	1776	
Ala	Ala	Leu	Gly	Phe	Ile	Ser	Thr	Leu	Ala	Ile	Leu	Leu	Ile	Phe	Trp		
		580						585							590		
aga	cat	ttc	cag	acg	ccc	atg	gtg	cgc	tcg	gcg	ggc	ggc	ccc	atg	tgc	1824	
Arg	His	Phe	Gln	Thr	Pro	Met	Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Gly	Pro	Met	Cys		
	595					600									605		
ttc	ctg	atg	ctg	gtg	ccc	ctg	ctg	ctg	gcg	ttc	ggg	atg	gtc	ccc	gtg	1872	
Phe	Leu	Met	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Met	Val	Pro	Val		
	610					615									620		
tat	gtg	ggc	ccc	ccc	acg	gtc	ttc	tcc	tgt	ttc	tgc	cgc	cag	gct	ttc	1920	
Tyr	Val	Gly	Pro	Pro	Thr	Val	Phe	Ser	Cys	Phe	Cys	Arg	Gln	Ala	Phe		
625					630					635					640		
ttc	acc	gtt	tgc	ttc	tcc	gtc	tgc	ctc	tcc	tgc	atc	acg	gtg	cgc	tcc	1968	
Phe	Thr	Val	Cys	Phe	Ser	Val	Cys	Leu	Ser	Cys	Ile	Thr	Val	Arg	Ser		
				645						650					655		
ttc	cag	att	gtg	tgc	gtc	ttc	aag	atg	gcc	aga	cgc	ctg	cca	agc	gcc	2016	
Phe	Gln	Ile	Val	Cys	Val	Phe	Lys	Met	Ala	Arg	Arg	Leu	Pro	Ser	Ala		
		660								665					670		
tac	ggt	ttc	tgg	atg	cgt	tac	cac	ggg	ccc	tac	gtc	ttc	gtg	gcc	ttc	2064	
Tyr	Gly	Phe	Trp	Met	Arg	Tyr	His	Gly	Pro	Tyr	Val	Phe	Val	Ala	Phe		
	675							680							685		

atc acg gcc gtc aag gtg gcc ctg gtg gcg ggc aac atg ctg gcc acc 2112
 Ile Thr Ala Val Lys Val Ala Leu Val Ala Gly Asn Met Leu Ala Thr
 690 695 700
 acc atc aac ccc att ggc cgg acc gac ccc gat gac ccc aat atc ata 2160
 Thr Ile Asn Pro Ile Gly Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Asn Ile Ile
 705 710 715 720
 atc ctc tcc tgc cac cct aac tac cgc aac ggg cta ctc ttc aac acc 2208
 Ile Leu Ser Cys His Pro Asn Tyr Arg Asn Gly Leu Leu Phe Asn Thr
 725 730 735
 agc atg gac ttg ctg ctg tcc gtg ctg ggt ttc agc ttc gcg tac gtg 2256
 Ser Met Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Val
 740 745 750
 ggc aag gaa ctg ccc acc aac tac aac gaa gcc aag ttc atc acc ctc 2304
 Gly Lys Glu Leu Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu
 755 760 765
 agc atg acc ttc tcc ttc acc tcc tcc atc tcc ctc tgc acg ttc atg 2352
 Ser Met Thr Phe Ser Phe Thr Ser Ser Ile Ser Leu Cys Thr Phe Met
 770 775 780
 tct gtc cac gat ggc gtg ctg gtc acc atc atg gat ctc ctg gtc act 2400
 Ser Val His Asp Gly Val Leu Val Thr Ile Met Asp Leu Leu Val Thr
 785 790 795 800
 gtg ctc aac ttt ctg gcc atc ggc ttg ggg tac ttt ggc ccc aaa tgt 2448
 Val Leu Asn Phe Leu Ala Ile Gly Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys
 805 810 815
 tac atg atc ctt ttc tac ccg gag cgc aac act tca gct tat ttc aat 2496
 Tyr Met Ile Leu Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Asn
 820 825 830
 agc atg att cag ggc tac acg atg agg aag agc tag
 Ser Met Ile Gln Gly Tyr Thr Met Arg Lys Ser

835

840

<210> 18

<211> 2577

<212> DNA

<213> mouse

<300>

<308>GENBANK AY032621

<400> 18

atg cca gct ttg gct atc atg ggt ctc agc ctg gct gct ttc ctg gag	48
Met Pro Ala Leu Ala Ile Met Gly Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Glu	
1 5 10 15	
ctt ggg atg ggg gcc tct ttg tgt ctg tca cag caa ttc aag gca caa	96
Leu Gly Met Gly Ala Ser Leu Cys Leu Ser Gln Gln Phe Lys Ala Gln	
20 25 30	
ggg gac tac ata ctg ggc ggg cta ttt ccc ctg ggc tca acc gag gag	144
Gly Asp Tyr Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Ser Thr Glu Glu	
35 40 45	
gcc act ctc aac cag aga aca caa ccc aac agc atc ccg tgc aac agg	192
Ala Thr Leu Asn Gln Arg Thr Gln Pro Asn Ser Ile Pro Cys Asn Arg	
50 55 60	
ttc tca ccc ctt ggt ttg ttc ctg gcc atg gct atg aag atg gct gtg	240
Phe Ser Pro Leu Gly Leu Phe Leu Ala Met Ala Met Lys Met Ala Val	
65 70 75 80	
gag gag atc aac aat gga tct gcc ttg ctc cct ggg ctg cgg ctg ggc	288
Glu Glu Ile Asn Asn Gly Ser Ala Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly	

85	90	95	
tat gac cta ttt gac aca tgc tcc gag cca gtg gtc acc atg aaa tcc			336
Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Thr Met Lys Ser			
100	105	110	
agt ctc atg ttc ctg gcc aag gtg ggc agt caa agc att gct gcc tac			384
Ser Leu Met Phe Leu Ala Lys Val Gly Ser Gln Ser Ile Ala Ala Tyr			
115	120	125	
tgc aac tac aca cag tac caa ccc cgt gtg ctg gct gtc atc ggc ccc			432
Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro			
130	135	140	
cac tca tca gag ctt gcc ctc att aca ggc aag ttc ttc agc ttc ttc			480
His Ser Ser Glu Leu Ala Leu Ile Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe			
145	150	155	160
ctc atg cca cag gtc agc tat agt gcc agc atg gat cgg cta agt gac			528
Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Ser Ala Ser Met Asp Arg Leu Ser Asp			
165	170	175	
cgg gaa acg ttt cca tcc ttc ttc cgc aca gtg ccc agt gac cgg gtg			576
Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val			
180	185	190	
cag ctg cag gca gtt gtg act ctg ttg cag aac ttc agc tgg aac tgg			624
Gln Leu Gln Ala Val Val Thr Leu Leu Gln Asn Phe Ser Trp Asn Trp			
195	200	205	
gtg gcc gcc tta ggg agt gat gat gac tat ggc cgg gaa ggt ctg agc			672
Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Glu Gly Leu Ser			
210	215	220	
atc ttt tct agt ctg gcc aat gca cga ggt atc tgc atc gca cat gag			720
Ile Phe Ser Ser Leu Ala Asn Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu			
225	230	235	240
ggc ctg gtg cca caa cat gac act agt ggc caa cag ttg ggc aag gtg			768

Gly Leu Val Pro Gln His Asp Thr Ser Gly Gln Gln Leu Gly Lys Val	
245	250
ctg gat gta cta cgc caa gtg aac caa agt aaa gta caa gtg gtg gtg	816
Leu Asp Val Leu Arg Gln Val Asn Gln Ser Lys Val Gln Val Val Val	
260	265
ctg ttt gcc tct gcc cgt gct gtc tac tcc ctt ttt agt tac agc atc	864
Leu Phe Ala Ser Ala Arg Ala Val Tyr Ser Leu Phe Ser Tyr Ser Ile	
275	280
cat cat ggc ctc tca ccc aag gta tgg gtg gcc agt gag tct tgg ctg	912
His His Gly Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ser Trp Leu	
290	295
aca tct gac ctg gtc atg aca ctt ccc aat att gcc cgt gtg ggc act	960
Thr Ser Asp Leu Val Met Thr Leu Pro Asn Ile Ala Arg Val Gly Thr	
305	310
gtg ctt ggg ttt ttg cag cgg ggt gcc cta ctg cct gaa ttt tcc cat	1008
Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Leu Leu Pro Glu Phe Ser His	
325	330
tat gtg gag act cac ctt gcc ctg gcc gct gac cca gca ttc tgt gcc	1056
Tyr Val Glu Thr His Leu Ala Leu Ala Ala Asp Pro Ala Phe Cys Ala	
340	345
tca ctg aat gcg gag ttg gat ctg gag gaa cat gtg atg ggg caa cgc	1104
Ser Leu Asn Ala Glu Leu Asp Leu Glu Glu His Val Met Gly Gln Arg	
355	360
tgt cca cgg tgt gac gac atc atg ctg cag aac cta tca tct ggg ctg	1152
Cys Pro Arg Cys Asp Asp Ile Met Leu Gln Asn Leu Ser Ser Gly Leu	
370	375
ttg cag aac cta tca gct ggg caa ttg cac cac caa ata ttt gca acc	1200
Leu Gln Asn Leu Ser Ala Gly Gln Leu His His Gln Ile Phe Ala Thr	
385	390
	395
	400

tat gca gct gtg tac agt gtg gct caa gcc ctt cac aac acc cta cag	1248
Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln	
405 410 415	
tgc aat gtc tca cat tgc cac gta tca gaa cat gtt cta ccc tgg cag	1296
Cys Asn Val Ser His Cys His Val Ser Glu His Val Leu Pro Trp Gln	
420 425 430	
ctc ctg gag aac atg tac aat atg agt ttc cat gct cga gac ttg aca	1344
Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn Met Ser Phe His Ala Arg Asp Leu Thr	
435 440 445	
cta cag ttt gat gct gaa ggg aat gta gac atg gaa tat gac ctg aag	1392
Leu Gln Phe Asp Ala Glu Gly Asn Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys	
450 455 460	
atg tgg gtg tgg cag agc cct aca cct gta tta cat act gtg ggc acc	1440
Met Trp Val Trp Gln Ser Pro Thr Pro Val Leu His Thr Val Gly Thr	
465 470 475 480	
ttc aac ggc acc ctt cag ctg cag cag tct aaa atg tac tgg cca ggc	1488
Phe Asn Gly Thr Leu Gln Leu Gln Gln Ser Lys Met Tyr Trp Pro Gly	
485 490 495	
aac cag gtg cca gtc tcc cag tgt tcc cgc cag tgc aaa gat ggc cag	1536
Asn Gln Val Pro Val Ser Gln Cys Ser Arg Gln Cys Lys Asp Gly Gln	
500 505 510	
gtt cgc cga gta aag ggc ttt cat tcc tgc tgc tat gac tgc gtg gac	1584
Val Arg Arg Val Lys Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp	
515 520 525	
tgc aag gcg ggc agc tac cgg aag cat cca gat gac ttc acc tgt act	1632
Cys Lys Ala Gly Ser Tyr Arg Lys His Pro Asp Asp Phe Thr Cys Thr	
530 535 540	
cca tgt aac cag gac cag tgg tcc cca gag aaa agc aca gcc tgc tta	1680
Pro Cys Asn Gln Asp Gln Trp Ser Pro Glu Lys Ser Thr Ala Cys Leu	

545	550	555	560	
cct cgc agg ccc aag ttt ctg gct tgg ggg gag cca gtt gtg ctg tca	1728			
Pro Arg Arg Pro Lys Phe Leu Ala Trp Gly Glu Pro Val Val Leu Ser				
565	570	575		
ctc ctc ctg ctg ctt tgc ctg gtg ctg ggt cta gca ctg gct gct ctg	1776			
Leu Leu Leu Leu Leu Cys Leu Val Leu Gly Leu Ala Leu Ala Ala Leu				
580	585	590		
ggg ctc tct gtc cac cac tgg gac agc cct ctt gtc cag gcc tca ggt	1824			
Gly Leu Ser Val His His Trp Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly				
595	600	605		
ggc tca cag ttc tgc ttt ggc ctg atc tgc cta ggc ctc ttc tgc ctc	1872			
Gly Ser Gln Phe Cys Phe Gly Leu Ile Cys Leu Gly Leu Phe Cys Leu				
610	615	620		
agt gtc ctt ctg ttc cca ggg cgg cca agc tct gcc agc tgc ctt gca	1920			
Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Arg Pro Ser Ser Ala Ser Cys Leu Ala				
625	630	635	640	
caa caa cca atg gct cac ctc cct ctc aca ggc tgc ctg agc aca ctc	1968			
Gln Gln Pro Met Ala His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu				
645	650	655		
ttc ctg caa gca gct gag acc ttt gtg gag tct gag ctg cca ctg agc	2016			
Phe Leu Gln Ala Ala Glu Thr Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser				
660	665	670		
tgg gca aac tgg cta tgc agc tac ctt cgg gga ctc tgg gcc tgg cta	2064			
Trp Ala Asn Trp Leu Cys Ser Tyr Leu Arg Gly Leu Trp Ala Trp Leu				
675	680	685		
gtg gta ctg ttg gcc act ttt gtg gag gca gca cta tgt gcc tgg tat	2112			
Val Val Leu Leu Ala Thr Phe Val Glu Ala Ala Leu Cys Ala Trp Tyr				
690	695	700		
ttg aac gct ttc cca cca gag gtg gtg aca gac tgg tca gtg ctg ccc	2160			

Leu Asn Ala Phe Pro Pro Glu Val Val Thr Asp Trp Ser Val Leu Pro
 705 710 715 720
 aca gag gta ctg gag cac tgc cac gtg cgt tcc tgg gtc agc ctg ggc 2208
 Thr Glu Val Leu Glu His Cys His Val Arg Ser Trp Val Ser Leu Gly
 725 730 735
 ttg gtg cac atc acc aat gca atg tta gct ttc ctc tgc ttt ctg ggc 2256
 Leu Val His Ile Thr Asn Ala Met Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly
 740 745 750
 act ttc ctg gta cag agc cag cct ggc cgc tac aac cgt gcc cgt ggt 2304
 Thr Phe Leu Val Gln Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly
 755 760 765
 ctc acc ttc gcc atg cta gct tat ttc atc acc tgg gtc tct ttt gtg 2352
 Leu Thr Phe Ala Met Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Trp Val Ser Phe Val
 770 775 780
 ccc ctc ctg gcc aat gtg cag gtg gcc tac cag cca gct gtg cag atg 2400
 Pro Leu Leu Ala Asn Val Gln Val Ala Tyr Gln Pro Ala Val Gln Met
 785 790 795 800
 ggt gct atc cta gtc tgt gcc ctg ggc atc ctg gtc acc ttc cac ctg 2448
 Gly Ala Ile Leu Val Cys Ala Leu Gly Ile Leu Val Thr Phe His Leu
 805 810 815
 ccc aag tgc tat gtg ctt ctt tgg ctg cca aag ctc aac acc cag gag 2496
 Pro Lys Cys Tyr Val Leu Leu Trp Leu Pro Lys Leu Asn Thr Gln Glu
 820 825 830
 ttc ttc ctg gga agg aat gcc aag aaa gca gca gat gag aac agt ggc 2544
 Phe Phe Leu Gly Arg Asn Ala Lys Lys Ala Ala Asp Glu Asn Ser Gly
 835 840 845
 ggt ggt gag gca gct cag gga cac aat gaa tga
 Gly Gly Glu Ala Ala Gln Gly His Asn Glu
 850 855

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

ggaattcatg cttttctggg cagctcacc

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

gcattacgat gcggccgctc aggtagtgcc gcagcgcc

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

ggaattcatg ggaccccagg cgaggac

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

gcattacgat gcggccgcct agctcttcct catcgtgtag

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

ggaattcatg ccagctttgg ctatcatgg

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

gcattacgat gcggccgctc attcattgtg ttcctgagct g

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明による G 蛋白質 α サブユニット $\alpha 15$ 及び $\alpha 16/Z$ 共発現ベクターの構造を示す。

【図 2】 本発明による T1R3 蛋白質発現ベクターの構造を示す。

【符号の説明】

EF1 promoter : 延長因子プロモーター

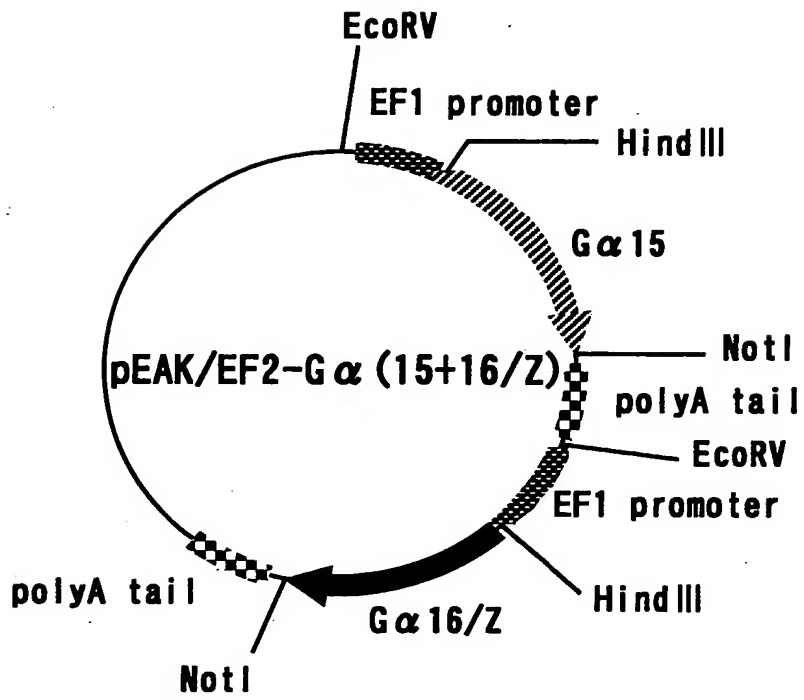
G $\alpha 15$: G 蛋白質 α サブユニット $\alpha 15$

polyA tail : ポリ A 付加シグナル

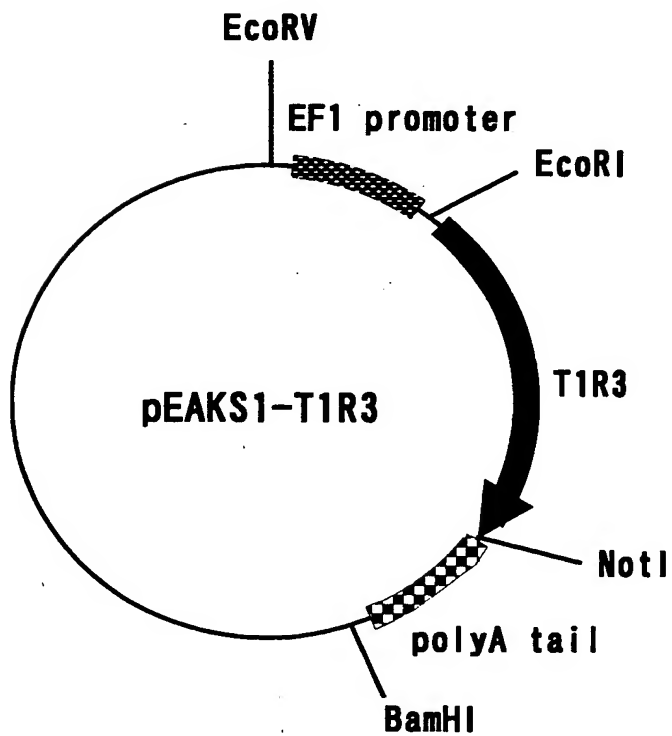
G $\alpha 16/Z$: G 蛋白質 α サブユニット $\alpha 16/Z$ キメラ蛋白質

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



特 2 0 0 2 - 3 2 1 8 8 7

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 哺乳動物におけるトレハロース受容体を解明し、それを用いて、抽出精製工程や誘導体化を必要とせず、試料中のトレハロースを直接的にかつ容易に検出する方法を提供することを課題とする。

【解決方法】 配列表における配列番号 1、2、3 及び 5 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、又は、配列表における配列番号 1、4 及び 5 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質からなる哺乳動物のトレハロース受容体、又はそれを発現させた動物細胞によるトレハロース検出方法を提供することにより課題を解決する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-321887
受付番号	50201671294
書類名	特許願
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成15年 1月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年11月 5日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000155908]

1. 変更年月日 1998年10月21日

[変更理由] 住所変更

住 所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
氏 名 株式会社林原生物化学研究所